蓖麻蚕 γ-谷氨酰转肽酶的研究

邹柏祥 林浩 许廷森
(中国科学院上海昆虫研究所) (中国科学院上海生物化学研究所)

摘要 L-γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GTP) 广泛分布在蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 的中肠、马氏管、后丝腺、脂肪体、体壁等组织中;并存在于蚕个体发育中的各个阶段。酶活力以马氏管、中肠为最大。在五龄蚕前中期各组织均显示 γ-GTP 最大活力。在脂肪体和表皮组织中,蛹形成时又分别出现 γ-GTP 活力峰。昆虫生长发育必需的 10 种氨基酸均是蚕各组织 γ-GTP 酶促反应的受体。这些结果表明,γ-GTP 作为L-γ-谷氨酰循环中一个关键酶,在蓖麻蚕体内对氨基酸的吸收和转运起着重要作用。

关键词 蓖麻蚕 L-γ-谷氨酰转肽酶

γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GTP) 又称 γ-谷氨酰转移酶, 它是谷胱甘肽 (GSH) 降解的起始酶,在该酶的催化下, GSH 中的 γ-谷氨酰转移到氨基酸受体上,反应式如下:

L-γ-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸 + L-氨基酸 → L-γ-谷氨酰 L-氨基酸
+ L-半胱氨酰-甘氨酸

在哺乳动物中,由以上反应形成的 L-γ-谷氨酰-L-氨基酸由 γ-谷氨酰环化转移酶催化形成 5-氧脯氨酸和游离氨基酸,从而使氨基酸由细胞外转运到细胞内。继而在 5-氧脯氨酸酶、L-谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶催化下又生物合成谷胱甘肽,完成一个γ-谷氨酰循环 (Meister 和 Anderson, 1983)。γ-GTP 在氨基酸转运过程中起着重要作用。该酶的另两种催化反应类型是自动转肽作用和水解作用。 γ-GTP 广泛地存在于哺乳动物、植物、微生物中。家蝇 (Bodnaryk 和 Bronskill 等, 1974)、伊蚊 (Hazelton 和 Lang, 1980)、蜜蜂 (Sobiech, 1981) 等昆虫中也存在 γ-GTP。

本文报道蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 各组织中 γ-GTP 的分布和五龄期间的活力变化以及各种氨基酸作为 γ-谷氨酰受体对该酶活力的影响。同时讨论了该酶在蚕体内的生理意义。

材料和方法

一、蓖麻蚕 实验室饲养的"印白黄"由广东省蚕种场提供。

二、试剂 γ-谷氨酰对硝基苯胺,各种氨基酸及双甘肽由上海生化所东风生化试剂厂生产。 D- 和 L-γ-谷氨酰苯肼 (D-OC 和 L-OC) 由美国康乃尔大学医学院生化系 Meister, A. 博士赠送。其他试剂均为分析纯。

三、γ-谷氨酰转肽酶的测定

1. 酶的制备 取出雌雄蚕的中肠、马氏管、丝腺等组织,在 4℃ 以 1:3 或 1:6 等不同

本文于 1984 年 5 月收到。
本工作承杨平澜、沈昭文先生的关心和鼓励。美国康乃尔大学医学院生化系 Meister, A. 博士赠送有关试剂。广东蚕种场提供实验材料,谨此致谢。

比例（W/V），用 MSE 匀浆器对蒸馏水匀浆，用尼龙纱布过滤去掉粗颗粒，匀浆液于冰箱中对水透析 4—6 小时后作为酶液；或取 100,000 × g 离心 1 小时的沉淀作酶液。

2. γ-谷氨酰转肽酶活力测定　以 γ-谷氨酰对硝基苯胺为底物的酶反应系统参照 Meister 等（1981）方法；酶解产物对硝基苯胺用乙酸乙酯提取后测定，参考 Ward (1973) 方法。

四、蛋白质浓度的测定　依 Lowry 等（1951）方法。

结果与讨论

一、γ-谷氨酰转肽酶在蓖麻蚕各种组织中的分布

蓖麻蚕各种组织中 γ-谷氨酰转肽酶的活力见表 1。从表可见，γ-谷氨酰转肽酶广泛分布在蓖麻蚕各种组织，其中马氏管、中肠酶活力最大。五龄期是蚕体迅速生长，蛋白质大量合成时期，需要从食物中吸取大量的氨基酸。中肠与马氏管 γ-GTP 活力很高，是与该组织的消化吸收的生理功能密切相关的。γ-GTP 在蓖麻蚕体内的广泛分布，正说明它在转运氨基酸中占有重要地位。

表 1　γ-谷氨酰转肽酶在蓖麻蚕各种组织中的分布*

组织名称	酶活力(毫微克分子/分/毫克蛋白)
1.后部丝腺	7.10
2.中肠	15.09
3.马氏管	17.60
4.脂肪体	6.15
5.体壁(1)	13.89
6.体壁(2)	0.34
7.翅膀	0.37
8.卵	1.12
9.头+神经索	0.50

* 后部丝腺、中肠、马氏管、脂肪体、体壁(1)等组织都是五龄三天的幼虫。体壁(2)、翅膀和卵、头+神经索是预成虫。

二、蓖麻蚕个体发育中 γ-谷氨酰转肽酶的变化

1. 中肠、马氏管 γ-谷氨酰转肽酶

中肠、马氏管的 γ-GTP 在个体发育中的变化见图 1 及图 2。由图 1 可见，中肠 γ-GTP 活力在四龄眠期活力甚低，起蚕后迅速上升，在盛食期(1.5—4 天)出现活力峰，熟蚕时下降到很低水平。我们曾观察了五龄蚕血液中各种游离氨基酸的变化，其中如必需氨基酸赖氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸、苏氨酸等，起蚕后 10 小时，浓度均低，在 1.5—3.5 天内浓度最大，熟蚕前一天又下降到只有最高浓度的 20%（邹柏祥等，1979）。血液中各种氨基酸的浓度取决于贮存和被利用之间的平衡。中前期平衡趋向贮存，而中后期由于蚕丝腺细胞大量合成丝蛋白，脂肪细胞大量合成贮存蛋白，血液中氨基酸趋向消耗。上述几种必需氨基酸均是中肠 γ-GTP 较好的受体，它们在血液中的浓度又都与 γ-GTP 活力峰相应。这就显示了中肠 γ-GTP 在蚕体对必需氨基酸的摄取过程中起着重要调节作用。

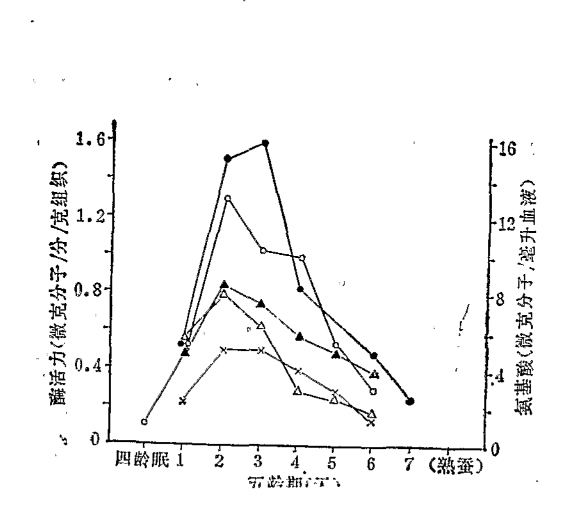


图 1 蓖麻蚕五龄期中肠 γ-GTP 活力和血液氨基酸浓度的变化

●——● γ—GTP ○——○ 苏氨酸 ▲——▲ 缬氨酸 △——△ 亮氨酸+异亮氨酸 ×——× 苯丙氨酸

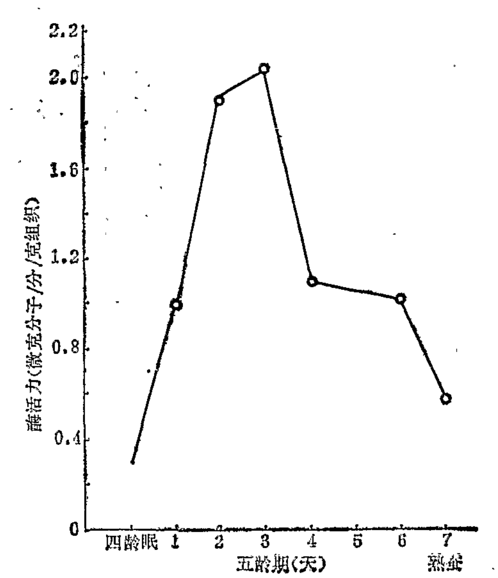


图 2 蓖麻蚕马氏管 γ-GTP 活力在五龄期间的变化

马氏管是排泄废物和再吸收对蚕有益的物质，其中包括对氨基酸的再吸收和利用。马氏管高活力的 γ-GTP 使蚕体充分利用氨基酸。

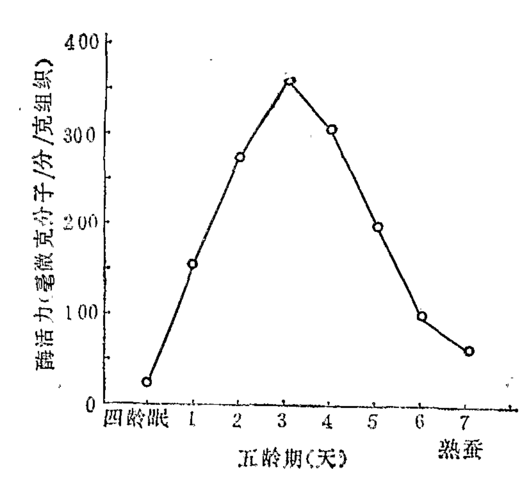


图 3 蓖麻蚕后丝腺 γ-GTP 活力在五龄期间的变化

2. 丝腺 γ-谷氨酰转肽酶

后丝腺的 γ-GTP 活力峰是在五龄中期，然后逐渐下降(见图 3)。有人观察到大鼠哺乳腺在生乳期 γ-GTP 活力极大增加，与乳腺蛋白合成的增加相适应 (Puente 等，1982)。以合成和分泌丝心蛋白为主要功能的后丝腺，其 γ-GTP 活力的变化与其生理功能相一致，看来富于蛋白合成和分泌的腺体，其 γ-GTP 对氨基酸的转运起着重要作用。

3. 脂肪体和体壁 γ-谷氨酰转肽酶

蚕脂肪体和表皮的 γ-GTP 的变化如图 4 所示。值得指出的是五龄中期和白蛹期出现的活力峰。天蚕蛾和家蚕在最后龄期的中期脂肪体大量合成贮存蛋白 (Tojo 等，1981)，末龄幼虫贮存蛋白约占血液总蛋白的 80% (Law，1980)，此时所需大量氨基酸可通过 γ-GTP 和转氨酶系统 (许廷森等，1980；林浩等，1980) 的联合作用来提供。

三、γ-GTP 的性质及其与各种氨基酸的相互作用

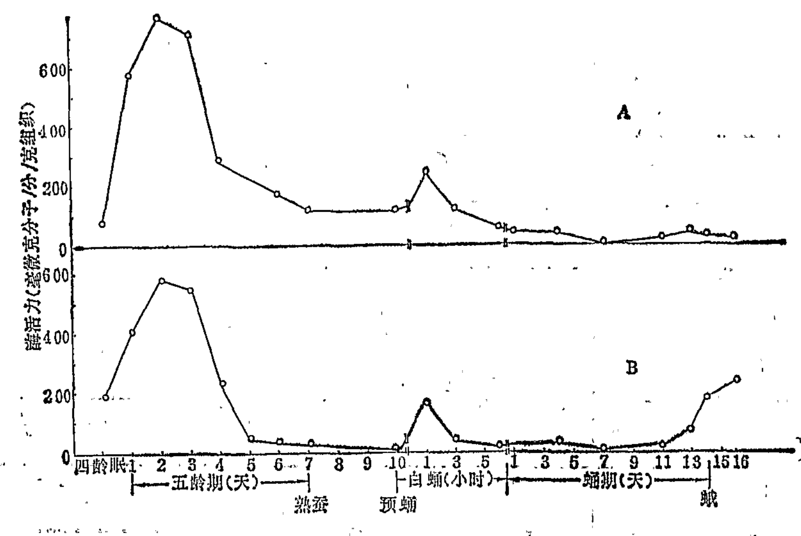


图 4　蓖麻蚕脂肪体和表皮 γ-GTP 活力在个体发育中的变化

A. 表皮 γ-GTP　B. 脂肪体 γ-GTP

1. 一般性质

蓖麻蚕 γ-GTP 是膜结合酶，细胞可溶部分(100,000×g 离心的上清液)没有可检出的活力。酶反应最适 pH 8.0—9.0 (图 5)。D- 和 L-γ-谷氨酰苯肼 (D-OC 和 L-OC) 在 2×10^{-4} 克分子浓度时，对 γ-GTP 分别抑制 60% 和 90%，L-OC 更有效。硼砂-丝氨酸溶液，1×10^{-3} 克分子浓度，能完全抑制该酶的活力 (表 2)。镁离子对该酶有促进作用，不被对氯汞苯甲酸抑制，表明游离巯基不是酶活性所必需。

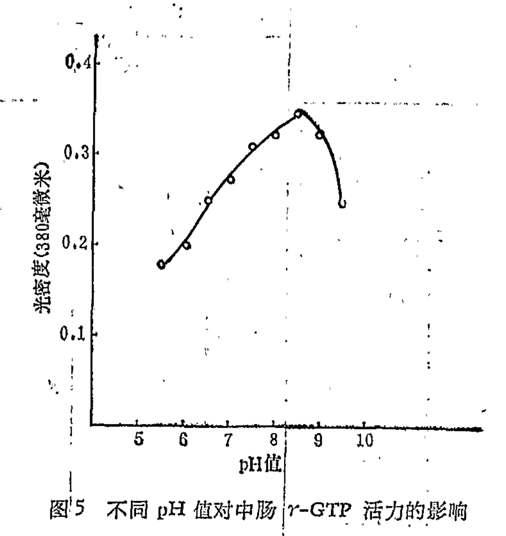


图 5　不同 pH 值对中肠 γ-GTP 活力的影响

2. 各种氨基酸对 γ-GTP 活力的影响

1) 对中肠、马氏管 γ-GTP 的影响　以 γ-谷氨酰对硝基苯胺为供体，分别加入各种氨基酸为受体的 γ-GTP 活力见表 3。中肠和马氏管的 γ-GTP 与氨基酸的相互作用相似，共有 14 种氨基酸和双甘肽能作为 γ-GTP 的受体。它们是精氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、天门冬酰胺、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、酪氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸和组氨酸。值得指出的是昆虫中的 10 种必需氨基酸均是 γ-GTP 的受体。而且随着氨基酸浓度的增加而成倍地促进 γ-GTP 的活力 (见表 4)。这意味着中肠内容物的氨基酸浓度越高，通过 γ-GTP 作用而进入中肠细胞就越多。

从表 3 还可看出，甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和天门冬氨酸均不是该酶的受体。这几种氨基酸对哺乳动物 γ-GTP 的影响也随不同种属而有差异。谷氨酸和甘氨酸抑制猪肾 γ-GTP，丙氨酸、天门冬氨酸、谷氨酰胺对该酶无甚影响 (Orlowski 和

表 2 一些化合物对蓖麻蚕中肠 γ-GTP 活力的影响*

化合物	浓度(克分子)	相对酶活力(%)
L-γ-谷氨酰苯肼	2×10^{-4}	11.1
D-γ-谷氨酰苯肼	2×10^{-4}	40.9
丝氨酸+硼砂	1×10^{-3}	0
对氯汞苯甲酸	1×10^{-3}	101
氯化镁	1×10^{-2}	163.5
—	—	100

* 酶为组织匀浆在 100,000×g 离心的沉淀部分(即微粒体)。

表 3 中肠和马氏管 γ-谷氨酰转肽酶和各种氨基酸的相互作用*

氨基酸	中肠		马氏管	
	酶活力(毫微克分子/分/毫克蛋白)	相对活力百分数(%)	酶活力(毫微克分子/分/毫克蛋白)	相对活力百分数(%)
—	10.25	100	20.12	100
甲硫氨酸	12.88	125.7	28.15	139.9
半胱氨酸	12.80	124.9	25.98	129.1
天门冬酰胺	12.08	117.9	24.68	122.7
苯丙氨酸	13.04	127.2	27.50	136.7
色氨酸	13.01	126.9	27.28	135.6
酪氨酸	10.87	106.1	22.43	111.4
苏氨酸	11.35	110.7	22.91	113.9
亮氨酸	12.56	120.5	24.68	122.7
异亮氨酸	12.24	119.4	23.60	117.3
缬氨酸	10.92	106.5	21.56	107.2
精氨酸	13.52	131.9	28.80	143.2
组氨酸	11.03	107.6	21.87	103.7
脯氨酸	11.59	113.1	21.56	107.2
赖氨酸	11.03	107.6	21.56	107.2
天门冬氨酸	9.21	89.9	18.27	90.8
丙氨酸	6.86	66.9	14.72	73.2
甘氨酸	8.78	85.7	17.67	87.8
丝氨酸	7.17	70.0	14.46	71.9
谷氨酰胺	4.75	46.4	9.31	46.3
谷氨酸	3.90	38.1	7.23	35.9
双甘肽	10.71	104.5	23.38	116.2

* 中肠和马氏管酶液用颗粒部分。酪氨酸的最终浓度为 1.4 毫克分子,其他氨基酸为 20 毫克分子浓度。

表 4　不同浓度的氨基酸对中肠 γ-谷氨酰转肽酶活力的影响*

氨基酸	浓度（毫克分子）	酶活力（毫微克分子/分/毫克蛋白）	相对活力百分数（%）
精氨酸	—	5.58	100
	20	8.27	148.2
	50	10.96	196.4
甲硫氨酸	—	3.77	100
	20	4.97	131.9
	50	6.59	174.0
半胱氨酸	—	3.77	100
	20	5.61	148.9
	50	8.05	213.3
苯丙氨酸	—	3.77	100
	20	5.12	135.8
	50	7.88	208.9
赖氨酸	—	3.77	100
	20	5.54	147.0
	50	8.61	228.3
谷氨酰胺	—	5.58	100
	5	4.38	78.5
	10	3.62	64.9
	20	1.68	30.1

* 利用 100,000×g 离心的沉淀部分作为酶源。

Meister，1965)。但对大鼠肾 γ-GTP，除天门冬氨酸外，其余 5 种氨基酸均是酶较好的受体（Tate 等，1974)。由此看来，γ-GTP 具有种属之间的差异，从而反映出不同生物对氨基酸的吸收和转运机制上的差异。

2）后丝腺 γ-GTP 与氨基酸的作用　后丝腺的 γ-GTP 与氨基酸的相互作用(见表 5)与中肠、马氏管的相似，有 14 种氨基酸充当该酶的受体。但丝蛋白的主要氨基酸甘氨酸和丙氨酸不是 γ-GTP 的受体。因此体液中游离氨基酸进入丝腺等组织的细胞中可能有以下几种途径：(1) 由浓度梯度扩散从细胞外直接进入细胞内；(2) 通过谷胱甘肽和有关氨基酸，在 γ-GTP 催化下，形成谷氨酰-氨基酸，由细胞外进入细胞内；(3) 由氨基酸的相应酮酸如 α-酮戊二酸、乙醛酸、丙酮酸等进入细胞(许廷森等，1964)，进而通过转氨酶系的作用(许廷森等，1980；邹柏祥等，1979；林浩等，1980)形成相应的氨基酸。对不同的氨基酸选择各自合适的传递途径进入细胞。

3）表皮 γ-GTP 与氨基酸的作用　从表 5 看出，五龄 3 天表皮 γ-谷氨酰转肽酶与各种氨基酸的作用和其他组织的结果基本相似。表皮硬化与黑化所需的芳香氨基酸如苯丙氨酸和酪氨酸都可作为表皮 γ-GTP 的受体。有意义的是，五龄三天与蛹后 1 小时的表皮 γ-GTP 与酪氨酸反应的相对活力分别为 105% 和 130%，这表明白蛹表皮细胞通过 γ-GTP 的作用，增加了对酪氨酸的吸收。

我们观察到蚕蜕皮变成蛹的 1 小时内，体壁基本上是白的(白蛹)，质地柔软。几小时

表 5 后部丝腺、脂肪体、体壁 γ-谷氨酰转肽酶和各种氨基酸的相互作用

氨基酸	后部丝腺		脂肪体		体壁(表皮)	
	酶活力(毫微克分子/分/毫克蛋白)	相对活力百分数(%)	酶活力(毫微克分子/分/毫克蛋白)	相对活力百分数(%)	酶活力(毫微克分子/分/毫克蛋白)	相对活力百分数(%)
—	2.57	100	3.34	100	4.07	100
甲硫氨酸	3.93	152.9	4.92	147.3	5.41	132.9
半胱氨酸	4.17	162.3	6.22	186.2	6.12	150.4
天门冬酰胺	2.98	116.0	4.62	138.3	4.47	109.8
苯丙氨酸	3.81	148.3	5.21	156.0	5.53	135.9
色氨酸	3.57	138.9	5.50	164.7	6.71	164.9
酪氨酸	2.62	102.0	4.18	125.2	4.24	104.2
苏氨酸	2.79	108.6	4.14	124.0	4.47	109.8
亮氨酸	3.22	125.3	4.98	149.1	4.66	114.5
异亮氨酸	3.29	128.0	5.09	152.4	4.75	116.7
缬氨酸	2.67	103.9	4.41	132.0	3.88	95.3
精氨酸	3.52	137.0	5.64	168.9	5.13	126.1
组氨酸	2.57	100	4.16	124.6	4.12	101.2
脯氨酸	2.62	102.0	3.90	116.8	3.58	88.0
赖氨酸	2.64	102.7	3.88	116.2	3.88	95.3
天门冬氨酸	2.19	85.2	2.97	88.9	3.22	79.1
丙氨酸	1.50	58.4	2.56	76.7	2.49	61.2
甘氨酸	2.05	79.8	3.08	92.2	3.06	75.2
丝氨酸	1.60	62.3	2.56	76.7	2.59	63.6
谷氨酰胺	0.79	30.7	1.60	47.9	1.55	38.1
谷氨酸	0.50	19.5	0.88	29.9	1.04	25.6
双甘肽	2.60	101.2	3.96	118.6	3.53	86.7

酪氨酸浓度为 1.4 毫克分子，其他氨基酸为 20 毫克分子浓度。

后蛹体即变硬带棕黄色。可见新蛹表皮的硬化和色化过程非常迅速。而这两个过程均与酪氨酸代谢密切相关。蓖麻蚕幼虫多酚氧化酶即酪氨酸酶活力变化和幼虫蜕皮循环相关联(许廷森和谢伟军，1982)。昆虫酪氨酸酶是双功能酶，它既能将酪氨酸羟基化变为多巴，也能将多巴和 N-乙酰多巴胺氧化变为相应的醌。这些醌通过不同的反应，分别形成骨质和黑色素，从而使表皮变硬和暗化(Brunet，1980)。由此看来，蓖麻蚕 γ-GTP 与表皮蛋白合成和表皮鞣化均有密切关系。

以上结果表明，γ-谷氨酰转肽酶在蚕体摄取和转运氨基酸中起重要作用，并与变态过程相关，因此很可能受激素的调节控制。对该酶的结构与功能及其调节的研究将有重要意义。

参 考 文 献

许廷森、王征泰 1964 蚕氨基酸代谢的研究 IV 幼虫体液及丝腺体中的 α-酮酸。生物化学与生物物理学报 4(4): 481—4。

邹伯祥、张汉云、林浩、许廷森 1979 家蚕与蓖麻蚕的氨基酸和形成甘氨酸、丙氨酸的酶系比较及酮丙二酸的脱羧作用。昆虫学报 22(4): 378—89。

林浩、臧祝英、邹柏祥、许廷森　1980　保幼激素类似物对形成甘氨酸和丙氨酸有关转氨酶的调节控制。生物化学与生物物理学报 **12**(4)：320—29。

许廷森、朱菊红、林浩、邹柏祥 1980　蚕氨基酸代谢的研究：精氨酸酶、鸟氨酸-δ 转氨酶和支链氨基酸转氨酶。昆虫学报 **23**(1)：1—8。

许廷森、谢伟军　1982　保幼激素类似物和 β-蜕皮素对酪氨酸转氨酶和多酚氧化酶的调节控制。生物化学与生物物理学报 **14**(4)：367—74。

Bodnaryk, R. P., J. F. Bronskill and J. K. Fetterly 1974 Membranebound γ-glutamyl transpeptidase and its role in phenylalanine absorption-reabsorption in the larvae of *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* **20**(1): 167—81.

Brunet, P. C. J. 1980 The metabolism of the aromatic amino acids concerned in the cross-linking of insect cuticle. *Insect Biochem.* **10**(5): 467—500.

Hazelton, G. A. and Lang, G. A. 1980 γ-Glutamyl transpeptidase activity during the life span of the mosquito, *Aedes aegypti*. *FED Proc.* **39**(6): abstract 474.

Law, J. H. Lipid- protein interactions in insects. in: "Insect Biology in the Future" ed. Locke, M. and Smith, D. S., Academic press, New York, London. 1980 pp295.

Lowry, O. N., Rosebrough, N. F., Farr, D. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—75.

Meister, A. and M. E. Anderson 1983 Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711—60.

Meister, A., S. S. Tate and O. W. Griffith 1981 γ-Glutamyl transpeptidase. in: "Methods in Enzymology" ed. Jakoby W. B., Academic Press, New York. **77**: 237—53.

Orlowski, M. and Meister, A 1965 Isolation of γ-Glutamyl transpeptidase from how Kidney. *J. Biol. Chem.* **240**(1): 338—47.

Puent, J., E. Castellon and M. Sapag-Hagar 1982 Glutathione and γ-Glutamyl cycle enzymes in rat mammary gland. *Experientia* 38(5): 531—32.

Sobiech, K. A. 1981 Comparative studies of intestinal γ-Glutamyl transpeptidase activity. *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* **70**(2): 255—6.

Tate, S. S. and Meisted, A. 1974 Interaction of γ-Glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.* **249**(23): 7593—602.

Tojo, S., Kiguchi, K. and Kimura, S. 1981 Hormonal control of storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **27**(7): 491—97.

Ward, C. W. 1973 Spectral data for modified assay of benzoylarginine *p*-nitroanilide-hydrolysing enzymes in crude extracts. *Analyt. Biochem.* **56**(2): 596—600.

STUDIES ON γ-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE IN *PHILOSAMIA CYNTHIA RICINI*

Zou Bai-xiang Lin How
(Shanghai Institute of Entomology Academia Sinica)

Xu Ting-sen
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Activities of γ-glutamyl transpeptidase (γ-GTP) in the midgut, Malpighian tubules, posterior silkgland, fat body and integument of the eri-silkworm *Philosamia cynthia ricini* were determined by using γ-glutemyl-ρ-nitroanilidae as the substrate. The specific activities in Malpighian tubules and midgut were higher than in other tissues. The γ-GTP activities in these two tissues reached the maxima on the second day to the fourth day of the fifth instar, since then they began to decline rapidly. The γ-GTP activity in the fat body and integument rose to maxima just after pupation and then decreased and became virtually undetectable at the close of pupal stage. But the γ-GTP activity in the fat body would rise again after adult emergence.

The biochemical study on the eri-silkworm γ-GTP revealed that the essential amino acids required for insect growth could serve very well as the receptors of this enzyme. The optimal pH for the γ-GTP activity ranged from 8.0 to 9.0 in different tissues. The enzymic activity was sensitive to the inhibition of L- and D-γ-glutamyl-(O-carboxy)-phenyl-hydrazide and serine-borax.

Our study confirms that γ-GTP is intimately related to amino acid absorption, transportation and transformation and finally to protein synthesis and development of the eri-silkworm.

Key words *Philosamia cynthia ricini*——γ-glutamyl transpetidae